



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 40 03 826 A 1**

⑤1 Int. Cl.⁵:
C 07 K 13/00
// C07K 3/20, 3/22,
B01D 15/00, C12N
15/62, 15/56, 15/54

⑳ Aktenzeichen: P 40 03 826.2
㉔ Anmeldetag: 8. 2. 90
㉕ Offenlegungstag: 14. 8. 91

DE 40 03 826 A 1

㉚ Anmelder:

Mikrogen Molekularbiologische
Entwicklungs-GmbH, 8000 München, DE

㉛ Vertreter:

Lederer, F., Dipl.-Chem. Dr., 8000 München; Riederer
Frhr. von Paar zu Schönau, A., Dipl.-Ing., 8300
Landshut; Keller, G., Dipl.-Biol. Univ. Dr. rer. nat.,
Pat.-Anwälte, 8000 München

㉜ Erfinder:

Soutschek, Erwin, Dr.; Motz, Manfred, Dr., 8000
München, DE

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤4 Immunologisch aktive Peptide des Parvovirus B19

⑤7 Es werden immunologisch aktive Polypeptide mit einer Teilamino-säuresequenz der Kapsidproteine VP1 und VP2 des Parvovirus B19 zur Verfügung gestellt, die eine kostengünstige, sensitive und spezifische Testdurchführung zur Bestimmung von Antikörpern gegen das humane Parvovirus B19 erlauben. Es werden kurze Peptidsequenzen identifiziert, die als Antigen eingesetzt zur Identifizierung von anti-B19-IgG-positiven Seren dienen. Weiterhin wird die Produktion dieser Peptide mit gentechnologischen Maßnahmen offenbart. Andere gentechnologisch produzierte Antigene, die stabil in einer hohen Ausbeute in E.coli produziert und aus diesen anschließend gereinigt werden können, dienen als zusätzliche Antigene für den IgG-Nachweis. Ein Set aus Antigenen schließlich erlaubt Testdurchführungen zur Bestimmung von IgM-Antikörpern gegen das Virus. Zusätzlich stellen die gentechnologisch erzeugten Bestandteile der Oberflächenproteine Substanzen dar, die für eine prophylaktische Immunisierung verwendet werden können.

DE 40 03 826 A 1

Beschreibung

Das humane Parvovirus B19 (im folgenden kurz: B19) wurde 1975 zufällig in Plasmaproben von Blutspendern (Cossart, Y.E., Fiet, A.M., Cant, B., Widdows, D.: Parvovirus-like particles in human sera. *Lancet* I (1975, 72–73) mittels Gegenstromelektrophorese entdeckt. In den letzten Jahren wurde gezeigt, daß B19 bei Patienten mit chronisch-hämolytischer Krise eine aplastische Krise verursachen kann und das ätiologische Agens des Erythema infectiosum (EI) ist.

B19 weist elektronenmikroskopisch eine Größe von ca. 20 nm auf. Die Partikel haben eine ikosaedrische Symmetrie. Neben den Viruspartikeln zeigen sich aus "leere" Kapside, die keine DNA enthalten. Die Dichte in CsCl₂ beträgt 1,36–1,40 g/ml. Das Virusgenom besteht aus einer einzelsträngigen DNA von 5,4 kb. In jedes Viruspartikel wird jeweils nur ein DNA-Strang von entweder Plus- oder Minusorientierung verpackt. B19 ist ein autonomes Parvovirus, d. h. es benötigt zur Replikation kein Helfervirus.

Das Kapsid besteht aus zwei Polypeptiden mit Molekulargewichten von 83 kDa (VP1) und 58 kDa (VP2). Zusätzlich lassen sich drei Nicht-Strukturproteine von 52, 63 und 71 kDa nachweisen.

Die DNA kodiert im 5'-Bereich für Strukturproteine des Kapsids. Die kodierenden Bereiche dieser Strukturproteine sind bis auf einen zusätzlichen N-Terminus des VP1 identisch. Verursacht wird dieser Unterschied durch "splicing"-Vorgänge auf der mRNA-Ebene, bei denen im Fall von VP2 der translationelle Start für VP1 herausgenommen wird und somit die Translation erst mit dem kürzeren VP2 starten kann.

Untersuchungen an verschiedenen, weltweit gefundenen B19-Isolaten zeigten, daß sich diese zum Teil durch Restriktionsenzym-Muster auf DNA-Ebene unterscheiden. Diese Unterschiede korrelieren allerdings nicht mit dem klinischen Spektrum der B19-Infektion.

Bisher konnte keine permanente Zelllinie gefunden werden, in der sich B19 vermehren läßt. Ebenso wenig gelang es bisher, für B19 ein Versuchs-Tiermodell zu etablieren. Allerdings läßt sich B19 in primären Knochenmarks-Zellen unter Anwesenheit von Erythropoetin vermehren. So konnte der Replikations-Mechanismus des Virus geklärt und gezeigt werden, daß Zellen der Erythropoese Zielzellen dieser Infektion sind. Inzwischen gelang die Inokulation von B19 in fetalen erythropoetischen Zellen und Erythroblasten eines Patienten mit chronisch myeloischer Leukämie.

B19 verursacht das Erythema infectiosum (Ringröteln), eine in der Regel benigne verlaufende Infektionserkrankung, die meist zwischen dem Kindes- und frühem Erwachsenenalter auftritt. Außerdem kann die B19-Infektion bei Patienten mit chronisch-hämolytischer Anämie (Sichelzellenanämie usw.) aplastische Krisen und bei Patienten mit angeborenen oder erworbenen Immundefizienzzuständen chronische Knochenmarks-Aplasien verursachen.

In der Schwangerschaft kann die B19-Infektion in etwa 10–15% zu Hydrops fetalis mit resultierendem interuterinalem Fruchttod führen. Ferner ist B19 mit dem Auftreten der Purpura Schönlein-Henoch assoziiert.

B19 wird in der Regel durch Tröpfcheninfektion, aber auch durch antigen-positive Blutkonserven und Gerinnungspräparate übertragen.

Da bisher keine permanente Zelllinie bekannt ist, in der sich B19 in großen Mengen gewinnen läßt, fehlt so eine Quelle zur Gewinnung von Antigen für diagnostische Tests. Bisher behilft man sich mit B19-Virus, das in Blutkonserven von Spendern, die sich gerade in virämischem Stadium der Infektion befinden, zufällig entdeckt wird.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, immunologisch aktive Polypeptide zur Verfügung zu stellen, die mit den hier vorgestellten Testsystemen den Nachweis von B19-spezifischen Antikörpern der IgG und IgM-Klasse ermöglichen. Damit ergeben sich folgende Anwendungsmöglichkeiten:

- Serodiagnose akuter bzw. abgelaufener B19-Infektionen in der Dermatologie, Hämatologie, Gynäkologie, Rheumatologie und Pädiatrie.
- Bestimmung des B19-Immunstatus bei Schwangeren.
- Untersuchung von Blutkonserven oder Plasmaspenden zum Ausschluß der Übertragung von B19-Antigenen, da durch anti-B19-IgG positives Blut oder Plasma höchstwahrscheinlich kein B19-Virus mehr übertragen werden kann.
- Selektion von anti-B19 positiven Plasmaspendern für die Produktion von B19-Hyperimmunglobulin-Präparaten.

Aufgrund des breiten klinischen Spektrums der durch B19 verursachten Erkrankungen sowie der Gefährdung für B19-seronegative Schwangere ist die Einführung von Testreagenzien dringend von Nöten.

Es hat sich herausgestellt, daß brauchbare immunologisch aktive Polypeptide nicht ohne weiteres hergestellt werden können. Die gentechnologische Darstellung von kurzen Peptiden ist ebenso wie die von großen Polypeptiden nur dann in einer zufriedenstellenden Ausbeute möglich, wenn geeignete Expressionsvektoren verwendet werden. Verhältnismäßig kurze Peptide können zwar leicht synthetisch hergestellt werden, erforderlich ist jedoch eine genauere Kenntnis der immunologischen Wirksamkeit.

Gegenstand der Erfindung sind immunologisch aktive Peptide, die einen Teil der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine VP 1 oder VP 2 des Parvovirus B19 aufweisen. Diese Peptide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie frei sind von Verunreinigungen, die den Nachweis von gegen Parvovirus B19 gerichteten Antikörpern stören. Diese Eigenschaft ist von großer Bedeutung, da solche Präparationen von Peptiden nicht brauchbar sind, die aufgrund der Herstellung Bestandteile enthalten, die mit den nachzuweisenden Antikörpern reagieren. Ein Beispiel für eine derart unerwünschte Verunreinigung ist Protein A, das spezifisch mit dem Fc-Anteil der erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide ist, daß sie durch die erfindungsgemäßen Herstellungsverfahren in guter Ausbeute hergestellt werden können. Werden nämlich die für einen diagnostischen Test benötig-

ten Antigene nicht in einer ausreichenden Menge bei den Herstellungsverfahren synthetisiert, kann nicht die erforderliche Ausbeute nach den anschließenden Reinigungsverfahren erhalten werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnten weiterhin kurze Peptidsegmente aus dem VP 1 bestimmt werden, deren Epitope zum zuverlässigen Nachweis von Antikörpern gegen Parvovirus B19 in den Untersuchungsflüssigkeiten, insbesondere Seren geeignet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung wird dieser kleine, immundominante und B19-spezifische Bereich im serologischen Test eingesetzt. Besonders bevorzugt wird dabei ein Gemisch synthetischer Peptide eingesetzt, wobei diese Peptide die in Beispiel 3 gezeigten Aminosäuresequenzen PAPEP 1 – PAPEP 8 aufweisen.

In einer anderen bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die in Abbildung 2 dargestellten Aminosäuresequenzen der gentechnologisch dargestellten immunologisch aktiven Peptide PAN-1, PAN-2, PAN-3, PAN-4, PCE, PANSE und PAPST eingesetzt. Hierbei ist es in der Regel ausreichend, wenn ein Peptid in dem Test verwendet wird. In besonderen Fällen können aber auch zwei oder mehr dieser Peptide eingesetzt werden.

Hergestellt werden können die erfindungsgemäßen Peptide entweder synthetisch oder gentechnologisch. Bevorzugt werden die kurzen Peptide, die in Beispiel 3 näher erläutert sind, synthetisch hergestellt. Die längeren Peptide jedoch werden bevorzugt gentechnologisch hergestellt.

Zunächst wurden die kodierenden Bereiche in viralen DNA mittels zweier Polymerase-Ketten-Reaktionen (polymerase chain reaction, PCR) aus dem Serum eines infizierten Patienten amplifiziert und in Plasmiden für die weitere Vermehrung in *Escherichia (E.) coli* kloniert. Nach weiteren Subklonierungsschritten wurden dann verschiedene Bereiche daraus in *E. coli* gentechnologisch exprimiert und die dabei entstehenden Antigene auf ihre Verwendung für den Nachweis von Antikörpern gegen das Virus untersucht. Eine direkte Herstellung der erfindungsgemäßen Peptide in Expressionsvektoren ist aufgrund verschiedener Schwierigkeiten nicht möglich. Erfindungsgemäß wird daher das virale Proteinsegment an ein stabil exprimierbares Protein anfusioniert. Dieses Fusionsprotein kann nach der Aufreinigung direkt als Antigen für den IgG-Nachweis eingesetzt werden. Bevorzugt wird jedoch der Parvovirus spezifische Anteil durch geeignete Methoden abgespalten, weiter aufgereinigt und dann für serologische Tests eingesetzt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin Testkits für die Bestimmung von Antikörpern, die gegen Parvovirus B19 gerichtet sind. Die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide können grundsätzlich in allen diagnostischen Testkits zum Nachweis von Antikörpern gegen Parvovirus B19 verwendet werden. In einer bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen Testkits wird die Festphase geeigneter Mikrotiterplatten oder Polystyrol-Kugeln mit den erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptiden beschichtet. Nach Inkubation mit der Untersuchungsflüssigkeit (Serum-Probe) in einer geeigneten Verdünnung wird nach üblichen Waschschritten Enzym- oder radioaktiv-markiertes anti-human-IgG zugegeben. Das Ausmaß der Substratumsetzung bzw. der gebundenen Radioaktivität zeigt dann an, ob in der Serum-Probe gegen Parvovirus B19 gerichtete Antikörper vorhanden sind.

Die erfindungsgemäßen Testkits werden üblicherweise an Laboratorien von Ärzten, Krankenhäusern, Untersuchungsanstalten etc. geliefert. Sie enthalten regelmäßig alle zur Testdurchführung benötigten Reagenzien. Übliche Testreagenzien wie Pufferlösungen etc. werden jedoch manchmal nicht mitgeliefert. In der Regel enthalten die Testkits Mikrotiterplatten oder Polystyrolkugeln, die entweder mit einem oder mehreren erfindungsgemäßen Peptiden, oder mit anti-Antikörpern beschichtet sind. Weiterhin können die Testkits, je nach Testprinzip, ein oder mehrere erfindungsgemäße Peptide enthalten. Schließlich umfassen die Testkits noch eine Anzeigeekomponente, die eine Auswertung des Testergebnisses ermöglicht.

Bei anderen bevorzugten Testkits werden die Antigene an die Festphase von Mikrotiterplatten oder Polystyrol-Kugeln gebunden. Nach Inkubation des Testserums, geeigneten Wasch- und Absättigungsschritten wird ein spezifischer, enzymatisch oder radioaktiv markierter Antikörper gegen die B19-Antigene zugegeben und dessen Substratumsetzung bzw. die gebundene Radioaktivität gemessen. Da es sich hierbei um einen Inhibitionstest handelt, zeigt eine geringe Substratumsetzung bzw. geringe Radioaktivität das Vorhandensein von spezifischen Antikörpern an.

Für den Nachweis von IgM-Antikörpern gegen B19 können die an Festphasen gekoppelten erfindungsgemäßen Peptide ebenfalls eingesetzt werden. Bei diesem Nachweisverfahren werden zunächst die IgG-Antikörper durch Zugabe von mit Protein A beschichteten Kugeln zu den Untersuchungsflüssigkeiten eliminiert. Der Nachweis von gebundenen Antikörpern erfolgt dann mit einem anti-human IgM-Antikörper, der enzymatisch oder radioaktiv markiert ist.

Bei einem weiteren bevorzugten Testkit wird das Prinzip des sog. "µ-capture assays" verwendet. Mittels an die feste Phase gebundenen anti-human IgM-Antikörpern wird zuerst das IgM aus der Untersuchungsflüssigkeit (Serum) gebunden. Dann werden die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide zugegeben. Das Ausmaß der Bindung der Antigene und somit die Menge an vorhandenem Anti-B19-IgM kann dadurch erfolgen, daß entweder die Antigene radioaktiv oder mit anderen Substanzen (Digoxigenin, Avidin) markiert sind und somit nachweisbar sind, oder daß ein zweiter markierter Antikörper gegen die B19-Antigene eingesetzt und dessen Bindung gemessen wird.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung ganz besonders bevorzugt sind die ELISA-(enzyme linked immunosorbent assay)-Testkits.

Erfindungsgemäß werden auch DNA-Sequenzen zur Verfügung gestellt, die für den direkten Nachweis des Virus in Untersuchungsproben (Seren, Biopsien etc) verwendet werden können. Bevorzugt werden zwei DNA-Primer verwendet, die sich spezifisch an DNA-Bereiche im VP1 anlagern. Mittels eines käuflich erhältlichen Polymerase-chain-reaction-Kits kann dann eine Amplifizierung des dazwischen liegenden Bereiches erreicht werden. Nachgewiesen wird die dann in geeigneter Weise fixierte amplifizierte DNA durch eine geeignete

DNA-Sequenz. Hergestellt wird diese für die Hybridisierung eingesetzte DNA mit Hilfe eines Plasmides, das den zwischen den beiden Primern liegenden DNA-Bereich enthält.

Selbstverständlich dürfen die Primer Sequenzen nicht in der zur Hybridisierung eingesetzten DNA vorhanden sein. Die Sequenz der verwendeten Primer und deren Anordnung zueinander ist in **Abb. 1** dargestellt.

Schließlich werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung auch Impfstoffe gegen Parvovirus B19 zur Verfügung gestellt. Hierbei werden die erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Peptide zusammen mit geeigneten Adjuvantien den zu schützenden Personen gegebenenfalls mehrmals appliziert. Die dadurch hervorgerufene Produktion von Antikörpern kann einen Schutz vor Infektion mit Parvovirus B19 bewirken.

Beispiel 1

Gewinnung von Parvovirus B19 VP 1- und VP 2-kodierenden Sequenzen aus Patientenserum

Von einem Patienten mit akuter Infektion (Erythema infectiosum) wurde aus 1 ml Serum virale DNA durch Proteinase K-Verdau in 1% SDS, Phenolextraktion und anschließender Alkohol-Fällung isoliert (diese und auch alle folgenden Schritte zur Gewinnung, Verarbeitung und Expression von DNA, sowie auch die Darstellung von rekombinanten Proteinen und grundlegende Schritte zu deren Reinigung sind in: Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J. (1982) Molecular cloning. Cold Spring Harbor, N.Y. ausführlich dargestellt). Diese DNA wurde in 50 µl TE-Puffer aufgenommen und jeweils dann 1 µl für die Amplifizierung mittels der "polymerase chain reaction" und synthetischen Oligodesoxynukleotiden eingesetzt. Für die Amplifizierung der kodierenden Bereiche der Oberflächenproteine wurden zwei Primer-Paare verwendet; eines davon für die Gewinnung des VP 1-Anteils, das zweite Paar für das gesamte VP 2. Die als Primer verwendeten Oligodesoxynukleotide besitzen an ihren jeweiligen 5'-Enden Sequenzen, die nicht mit der Parvovirus-Sequenz homolog sind, für Restriktionsenzym-Schnittstellen kodieren und deswegen geeignet sind, die aus der PCR entstandenen DNA-Fragmente in geeignete Vektoren zu klonieren. Es wurden die in **Abb. 1** mit 0-1 bis 0-5 bezeichneten Primer verwendet.

Jeweils fünf Ansätze mit je 1 µl isolierter Parvovirus DNA wurden mit den beiden Primer-Paaren in einem Volumen von 100 µl amplifiziert. Die Bedingungen dabei waren: 1,5 min Denaturierung bei 94°C, 2 min Anlagerung der Primer bei 45°C, 4 min Synthese bei 72°C; insgesamt 50 Zyklen; Puffer, Substrate und Tag-Polymerase wurden dabei nach Angaben des Herstellers (Cetus/Perkin-Elmer, Überlingen, BRD) eingesetzt.

Die amplifizierten DNA-Fragmente aus den beiden unterschiedlichen Ansätzen (für VP 1 und VP 2) wurden jeweils vereinigt, mittels Alkohol-Fällung präzipitiert, mit 70% Alkohol gewaschen, getrocknet, in einem Volumen von 200 µl TE-Puffer gelöst und mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII verdaut. Nach elektrophoretischer Auftrennung der Fragmente in einem 1,2%igen Agarose-Gel erfolgte dann die Isolierung der entsprechenden DNA-Banden (709bp für VP 1, 1074bp für VP 2) und Insertion in die EcoRI und HindIII Stellen des Vektors PUC12 (Pharmacia, Schweden). Nach Transformation der Plasmide in *E. coli* JM109 (Pharmacia, Schweden) wurden Bakterienklone mit Parvovirus-DNA-Inserts durch Restriktionsverdau charakterisiert. Die entsprechenden Klone erhielten die Namen pUC12PAN für den VP 1-Anteil-kodierenden Bereich und pUC12VP2 für den VP 2-kodierenden Bereich.

Beispiel 2

Gentechnologische Darstellung von VP 1-Anteil und VP 2 aus *E. coli*-Zellen.

VP1-Anteil

Aus dem Plasmid pUC12PAN wurde der VP1-kodierende Bereich mit BclI und HindIII (siehe **Abb. 1**, die HindIII-Stelle stammt aus dem pUC-Vektor) isoliert und hinter das 3'-Ende eines verkürzten β -Galactosidase-Gens des Vektors (z. B. pBD₂) in die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII inseriert. *E. coli*-Zellen mit daraus resultierenden Plasmiden exprimieren nach Induktion mit IPTG in großer Menge ein β -Gal::VP1-Fusionsprotein (ca. 67 kDA), welches im Immunoblot (Western Blot) sehr stark mit anti-Parvovirus B19-positiven Seren reagiert. Eine Reinigung dieses Proteins kann sehr leicht mit konventionellen Methoden erreicht werden, indem die Unlöslichkeit des Proteins ausgenutzt wird. Nach Lyse der Zellen wird die Pelletfraktion mit Detergentien wie Triton-X100 und Octyl-gluco-pyranosid gewaschen, das Fusionsprotein anschließend mit 8M Harnstoff/1% Mercaptoethanol in Lösung gebracht und durch DEAE-Chromatographie mit einem NaCl-Gradienten von zellulären Verunreinigungen abgetrennt.

Eine Abspaltung des VP1-Anteils aus dem Fusionsprotein kann durch BrCN-Spaltung erreicht werden, da die VP1-Proteinsequenz mit einem Methionin beginnt und in Fragment selbst diese Aminosäure nicht mehr auftaucht; im bakteriellen Fusionsanteil dagegen tritt Methionin relativ oft auf, so daß dieser Anteil in sehr kleine Bruchstücke zerlegt wird. Nach der Spaltung in 35% Ameisensäure und 0,1 mg/ml BrCN für 4 h bei Raumtemperatur wurde die Probe lyophilisiert, in 8 M Harnstoff, 2 mM DTE (Dithiothreitol) gelöst und mittels DEAE-Chromatographie in einem Na-Cl-Gradienten aufgereinigt. Das hieraus resultierende VP1-Fragment wurden PAN-1 benannt und kann direkt für serologische Bestimmungen verwendet werden. Die Aminosäuresequenz ist in **Abb. 2-1** angegeben.

2. Als weitere Konstrukte wurden Plasmide generiert, die für Fusionsproteine bestehend aus der Glutathion-S-Transferase aus *Schistosoma japonicum* (Smith, D.B. and Johnson, K.S.: Single step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene*, 67 (1988), 31-40 und dem VP1-Anteil kodieren. Es kann aber auch ein anderer Fusionspartner verwendet werden, solange dieser nicht den diagnostischen Test stört.

a; PCE

Aus pUC12PAN wurde das B19-DNA-Fragment nach BclI/PvuII Verdau (618bp) isoliert und in pGEX1 in die BamHI und SmaI Stellen integriert (pGEX1PAN). Das entstehende 52-kDA-Fusionsprotein wurde mittels Glutathion-gekoppelter Agarose aus dem Überstand gereinigt und als Antigen für die serologischen Tests in Beispiel 4 eingesetzt (Name: PCE). Die Aminosäure-Abfolge dieses Antigens ist in **Abb. 2-2** aufgeführt.

b; PAN-2

Aus pUC12PAN wurde ein 458bp Fragment mit BclI/HincII isoliert und nach Zwischenklonierung in anderen Vektoren in pGEX2 (pGEX2PAN) inseriert. Die Insertion des Fragments im selben Leserahmen kann auch durch die Verwendung von synthetischen Oligodesoxynukleotiden erreicht werden. An der Fusions-Stelle von Glutathion-S-Transferase und dem VP1-Segment ist die Aminosäure-Sequenz, die von Thrombin erkannt wird, so daß der B19-Anteil durch dieses Enzym vom Fusionspartner abgespalten werden kann. Es kann auch jeder andere Fusionspartner verwendet werden, wenn er diese Protease-Erkennungssequenz besitzt. Die Aminosäure-Sequenz des Antigens, sowie anfusionierte Fremdaminosäuren (in Fettdruck) in **Abb. 2-3** angegeben.

c; PAN-3

Aus pUC12PAN wurde ein 458bp Fragment mit BclI/HincII isoliert und nach Zwischenklonierungen in anderen Vektoren in pGEX3 (pGEX3PAN) inseriert. Die Insertion des Fragments im selben Leserahmen kann auch durch die Verwendung von synthetischen Oligodesoxynukleotiden erreicht werden. An der Fusions-Stelle von Glutathion-S-Transferase und dem VP1-Segment ist die Aminosäure-Sequenz, die vom Protease Faktor Xa erkannt wird, so daß der B19-Anteil durch dieses Enzym vom Fusionspartner abgespalten werden kann. Es kann auch jeder andere Fusionspartner verwendet werden, wenn er diese Protease-Erkennungssequenz besitzt. Die Aminosäure-Sequenz des Antigens, sowie anfusionierte Fremdaminosäuren (in Fettdruck) ist in **Abb. 2-3** angegeben.

d; PAN-4

Aus pUC12PAN wurde das gesamte B19-DNA-Insert durch BclI und PstI Verdau gewonnen und nach verschiedenen Zwischenklonierungs-Schritten in den Vektor pGEX2 inseriert. Die Insertion des Fragments im selben Leserahmen kann auch durch die Verwendung von synthetischen Oligodesoxynukleotiden erreicht werden. An der Fusions-Stelle von Glutathion-S-Transferase und dem VP1-Segment ist die Aminosäure-Sequenz für die Protease Thrombin, so daß der B19-Anteil durch dieses Enzym vom Fusionspartner abgespalten werden kann. Es kann auch ein geeigneter anderer Fusionspartner verwendet werden, wenn er diese Protease-Erkennungssequenz besitzt. Die Aminosäure-Sequenz des Antigens, sowie anfusionierte Fremdaminosäuren (in Fettdruck) ist in **Abb. 2-5** angegeben.

Eine Reinigung der Antigene kann durch einfache Affinitäts-Chromatographie mit einer Glutathion-gekoppelten Gelmatrix erreicht werden. Die Reinigung ist durch diesen Schritt ausreichend effizient, um diese Proteine dann in serologischen Tests zu verwenden. Kreuzreaktionen mit dem Schistosoma Proteinanteil treten nicht auf.

Zur zusätzlichen Aufreinigung der auf pGEX 2 und 3 beruhenden Fusionsproteine wurde eine Abspaltung des B19-Anteils durch Verdau mit Thrombin bzw. Faktor X nach Angaben des Herstellers (Boehringer Mannheim) durchgeführt. Die Bruchstücke wurden dann nochmals Affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die S-Glutathion-Transferase kann dabei selektiv herausgefischt werden, der Parvovirus Proteinanteil ist in Durchlauf zu finden und kann nach einer abschließenden DEAE-chromatographischen Auftrennung in serologischen Tests eingesetzt werden.

Alternativ hierzu kann aber auch die Protease direkt zu der Glutathion-gekoppelten Gelsuspension mit dem angebundenen Fusionsprotein gegeben werden. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 h läßt sich das abgespaltene VP1-Fragment aus dem Gel waschen, während der Glutathion-S-Transferase-Anteil an die Gelmatrix gebunden bleibt.

VP-2

1. VP-2

Bedingt durch die Auswahl der PCR-Primer sowie des Vektors ist der kodierende Bereich für VP2 im Plasmid pUC12VP2 bereits im richtigen Leserahmen und kann nach Induktion mit IPTG aus der unlöslichen Fraktion des Bakterienlysats, ähnlich wie für pBD2PAN beschrieben, aufgereinigt werden. Die Aminosäure-Sequenz des rekombinanten Antigens ist in **Abb. 2-6** gezeigt.

2. PANSE

Überraschenderweise zeigte sich, daß eine Verkürzung der VP2-kodierenden Sequenz eine erhebliche Steigerung der Proteinausbeute mit sich bringt, daß dieses verkürzte Antigen stabil exprimierbar ist, auch während der Reinigung nicht degradiert wird sowie auch noch dieselbe Reaktivität mit anti-B19 positiven Seren aufweist. Dieses Expressionsplasmid (pUC19PANSE) wurde erhalten, indem der 5'-Bereich von VP2 um 355bp bis zu

einer NsiI-Stelle verkürzt wurde. Dieses Fragment wurde in pUC19 (Pharmacia, Schweden) inseriert, das denselben Leserahmen im lacZ-Peptid aufweist wie die B19 Sequenz. Da aufgrund der PCR Primer am 3'-Ende eine HindIII-Stelle sitzt, mußte durch Zwischenklonierung noch eine EcoRI-Stelle geschaffen werden, um das gewünschte Fragment in die PstI und EcoRI Stellen von pUC19 inserieren zu können.

Das Antigen mit einer Größe von ca. 38kDa (PANSE) kann sehr einfach aus der Pellet-Fraktion des Bakterien-Lysats nach Lösen in 4M Harnstoff durch DEAE-Chromatographie von Verunreinigungen getrennt werden. Die Aminosäure-Sequenz des Antigens ist in Abb. 2-7 angegeben.

3. PAPST

Von dem Plasmid pUC12VP2 wurde durch PstI Verau ein 716bp großes Fragment isoliert, das den N-terminalen Bereich von VP-2 kodiert. Nach Insertion des Fragments in den Vektor pUC9 (Pharmacia, Schweden) in die selbe Orientierung der Leserahmen wie dem lacZ des Vektors (charakterisiert durch Restriktionsenzym-Verdau) wird das B19-Antigen mit einer Größe von ca. 33kDa in sehr großer Menge (ca. 10% des Gesamt-E. coli-Proteins) produziert. Eine Aufreinigung kann ähnlich wie bei pBDAN aus den unlöslichen Bestandteilen durch Lösen in 8M Harnstoff und anschließende DEAE-Chromatographie erfolgen. Die Aminosäure-Sequenz ist in Abb. 2-8 aufgezeigt.

gesamtes VP1/VP2

Das Plasmid pUC12PAN wurde mit PstI und HindIII geöffnet und der VP2 kodierende Bereich aus pUC12VP2 nach HindIII und partiellem PstI-Verdau als 1,7kb Fragment inseriert (pUC12VP1/2). Aus dem so erhaltenen Plasmid pUC12VP1/2 mit der gesamten VP1 und VP2 kodierenden Region wurde nach EcoRI- und HindIII-Verdau ein 2,4 kb Fragment isoliert und in den eukaryotischen Expressionsvektor pMDIII (Mutz, M., Deby, G., Jilg, W., Wolf, H.: Expression of the Epstein-barr virus major membrane proteins in Chinese hamster ovary cells. Gene, 44 (1986) 353-359. (Erhältlich bei ATCC)) nach EcoRI und HindIII Verdau inseriert. Dieses Plasmid wurde anschließend wieder mit Sall linearisiert und noch ein 2,4 kb Sall-Fragment mit einem Dihydrofolat-Reduktase-Gen (DHFR) sowie Regulationssequenzen eingesetzt. Das so erhaltene Plasmid pMCIII/VP1/2 wurde in DHFR-negative CHO-Zellen transfiziert. Nach der Selektion auf alpha-minus Medium (gibco) wurden entstehende Kolonien isoliert und nach dem Auswachsen mit steigenden Konzentrationen an Methotrexat (MTX) amplifiziert. Von diesen Zellkulturen können Partikel mit VP1/VP2 aus dem Kulturüberstand gereinigt werden.

Weiterhin wurde das 2,4 kb-Fragment aus pUC12VP1/2 nach EcoRI/HindIII-Verdau in einen Vektor inseriert, der neben der HindIII-Stelle noch eine BamHI-Stelle besitzt. Von diesem Zwischenkonstrukt wurde dann der Parvovirus-Anteil als BclI und BamHI-Fragment isoliert und in die BamHI-Stelle eines Bakulovirus-Expressionsvektors (verwendet werden können verschiedene Konstrukte) inseriert. (Die BclI-Stelle sitzt unmittelbar vor dem translationellen Start von VP1, sie ist durch die PCR-Primer kodiert, siehe Abb. 1; der BamHI-Verdau muß partiell durchgeführt werden, da in der Parvovirus-Sequenz sich auch noch eine solche Stelle befindet). Nach co-Transfektion des entstandenen Plasmids mit Wildtyp-Bakulovirus-DNA in eine Insekten-Zellkultur-Linie werden Zellen isoliert, die keine sogenannten "inclusion bodies" aufweisen. Aus solchen Zellen, bei denen das Bakulovirus Polyhedrin-Gen durch das VP1/2-Gen ersetzt ist, läßt sich das intrazellulär gebildete VP1 in großer Menge aufreinigen.

Beispiel 3

Synthetische Peptide mit immundominanten Epitopen

Aus den Reaktionsmustern der bakteriellen Expressionsprodukte (insbesondere pGEX::VP1-Fusionskonstrukte) mit Parvovirus-positiven Seren im Western Blot läßt sich die überraschende Folgerung ziehen, daß ein kurzes Fragment aus dem VP1-Anteil ausreichend ist, um alle IgG-positiven Parvoseren zu identifizieren.

Das Fragment läßt sich mit folgenden synthetisch produzierbaren Peptiden abdecken:

PAPEP-1:

Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr

PAPEP-2:

Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser

PAPEP-3:

Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro - His Ala

PAPEP-4:

Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val

PAPEP-5:

Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp - Phe Arg Tyr Ser Gln Leu

PAPEP-6:

Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe

PAPEP-7:

Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser

5

PAPEP-8:

Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys His Ile Lys

Diese Antigene können in großen Mengen synthetisch problemlos hergestellt, aufgereinigt und dann im ELISA in Konzentrationen zwischen 100–200 ng pro Ansatz eingesetzt werden. 10

Auch wenn bereits mit einem der Peptide gute Ergebnisse erreicht werden können, ist die gemeinsame Verwendung von zwei oder drei Peptiden bevorzugt.

Für den Nachweis von IgG- oder IgM-Antikörpern können zum Teil unterschiedliche Peptide oder Kombinationen davon Verwendung finden. 15

Beispiel 4

Bestimmung von Serumantikörpern gegen das Parvovirus B19

20

Mit den in Beispiel 2 beschriebenen und gereinigten Antigenen wurde eine größere Menge an Seren auf ihre Reaktivität mit diesen Antigenen getestet. Dabei wurden die verschiedenen rekombinanten Proteine in einer Konzentration von 0,5–1 µg/ml in Carbonatpuffer, pH 9,5, in die Näpfe kommerziell erhältlicher ELISA-Platten für 16 h zum Anbinden gegeben. Nach dem Abwaschen von nicht-gebundenem Material können diese Platten dann im getrockneten Zustand bei 4°C gelagert werden. 25

Die Inkubation mit den Seren für 2 h erfolgte in einer Verdünnung von 1 : 100, die anschließenden Waschprozeduren und der Nachweis gebundener Antikörper mit einem Peroxidase-gekoppelten anti-human-IgG Antikörper erfolgte nach üblichen Testprozeduren.

Getestet wurden verschiedene Serumpanels auf anti-B19-IgG:

1. Seren eines Patienten mit akuter B19-Infektion wurden konsekutiv ab Auftreten des Erythema infectiosum bis 19 Wochen nach Erkrankung untersucht. 30

Ergebnis

Sowohl mit dem Fusionsprotein aus pGEX1PAN (PCE, siehe Beispiel 2) und mit einem durch BrCN abgespaltenen VP-1 Bereich (PAN-1, siehe Beispiel 2) und auch mit einem durch Thrombin abgespaltenen VP1-Anteil (PAN-4) als Antigene wurden alle Seren bereits ab Beginn der klinischen Manifestation als anti-B19-IgG positiv erkannt und blieben über den Beobachtungszeitraum (19 Wochen) positiv. 35

2. Auf anti-B19-IgG wurden Serumpaare von Schwangeren (n = 21) getestet, denen bei Hospitalisierung und vier Wochen später eine Serumprobe entnommen wurde. Es wurden für jedes Antigen dieselben Testseren verwendet. 40

Ergebnis

PCE

45

Von den 21 Schwangeren waren 15 zum Zeitpunkt der Hospitalisierung anti-B19 negativ, 6 Grauen anti-B19-IgG positiv. Das serologische Ergebnis der Zweitserumprobe vier Wochen später ergab ein identisches Ergebnis. 50

PAN-2

Von den 21 Schwangeren waren 14 zum Zeitpunkt der Hospitalisierung anti-B19-IgG negativ, 7 Frauen anti-B19 positiv. Bei der Retestung von Serumproben, die vier Wochen später diesen Frauen abgenommen wurden, ließen sich bei einer Frau, die zuvor anti-B19-IgG positiv war, kein IgG mehr nachweisen. 55

PAN-4

Von den 21 Schwangeren waren 15 zum Zeitpunkt der Hospitalisierung anti-B19 negativ, 6 Grauen anti-B19-IgG positiv. Das serologische Ergebnis der Zweitserumprobe vier Wochen später ergab ein identisches Ergebnis. 60

Dieser Versuch belegt die hohe Zuverlässigkeit des unter Verwendung der erfindungsgemäßen immunologisch aktiven Polypeptide durchgeführten Testes.

Der VP2-Bereich, enthalten in dem "PANSE, PAPST und VP-2" benannten Antigenen bringt für die Bestimmung von Antikörpern aus Patienten mit lang abgelaufener Infektion keine zusätzliche Steigerung der Sensitivität. Eine gute Reaktion mit diesen Antigenen dagegen ist bei Seren mit erst kurz zurückliegender Infektion zu finden. Deshalb ist dieses Antigen geeignet, eine Aussage über den Zeitpunkt der Infektion zu machen. 65

In einem Testkit kann eines oder eine Mischung dieser Antigene entweder zu den gentechnologisch erzeugten

VP1-Anteilen bzw. zum synthetischen Peptid zugemischt werden, oder aber in getrennten Ansätzen verwendet werden, wo die Diskriminierung der Reaktivität gegen diese beiden Bereiche eine zusätzliche Aussage über den Infektionszeitpunkt erlaubt.

Eine Anwendung der Antigene in der Bestimmung der IgM-Antikörper bei frischen Parvovirus-Infektionen erfolgte nach demselben Testprinzip wie bei der IgG-Bestimmung, jedoch wurden die Antigene in einer 10fach höheren Konzentration an die Platten gebunden, weiterhin erfolgte eine Elimination der Serum IgG-Antikörper durch Prä-Adsorption mit Protein A-gekoppelten Kugeln. Die verwendeten IgM-positiven Seren stammten von klinisch definierten Fällen und waren zuvor in einem IgM-Test überprüft worden, der gereinigtes Virus als Antigen verwendet. Ein Testansatz mit rekombinanten Antigenen aus dem VP1 und VP2 Bereich erkannte auch alle IgM-positiven Seren. Es zeigte sich, daß die VP2-Anteile "PAPST, VP2 aber besonders PANSE" hier besser reaktiv als im IgG-Test sind. In einem kommerziellen Testkit für IgM werden deshalb beide Bereiche vertreten sein.

Eine weitere Verbesserung der Sensitivität läßt sich durch ein selektives Anbinden der Serum-IgM-Antikörper an die feste Phase mittels monoklonaler Antikörper, Zugabe von rekombinanten Antigenen sowie der Bestimmung der Anbindung erzielen (μ -capture assay).

Beispiel 5

Verwendung B19-spezifischer DNA-Primer für den direkten Erregernachweis

Eventuell vorhandene B19-DNA wurden aus den Untersuchungsproben (Serum, Biopsien) durch Proteinase K-Verdau in Gegenwart von 1% SDS (2 h, 37°C), Phenol-Extraktion und Fällung in 70% Ethanol gewonnen. Diese und auch die dann folgende DNA-Amplifizierung wurde analog zu der in Beispiel 1 beschriebenen Prozedur durchgeführt. Verwendet wurden Primer O-5 und O-2 (Sequenz und Lage auf dem B19-Genom siehe Abb. 1); bei B19-positiven Proben besitzt das amplifizierte Fragment eine Größe von 319 bp. Der Nachweis der B19-Spezifität des DNA-Fragments erfolgte nach Auftrennung der PCR-Ansätze durch ein 1,5%iges Agarose-Gel, Transfer der DNA auf eine Nitrozellulose-Membran (Southern Blot) und Hybridisierung mit einem dazwischenliegenden DNA-Stück, das entweder radioaktiv mit ^{32}P oder Digoxigenin mittels konventioneller Methoden (primer extension) markiert worden war. Das zur Hybridisierung verwendete DNA-Fragment wurde auf folgende Art gewonnen: Aus dem Plasmid pUC12PAN wurde nach Verdau mit HincII und PstI ein 260bp langes DNA-Fragment isoliert und in pUC12 in die HincII und PstI Stellen inseriert. Aus dem resultierenden Plasmid (pUC12PCRDIA) kann nun das B19-Fragment ohne die zur Amplifizierung verwendeten Sequenzen durch EcoRI/PstI-Verdau gewonnen werden und nach Markierung als Hybridisierungsprobe eingesetzt werden.

Beschreibung der Abbildungen

Abb. 1 Schematische Darstellung des VP1/2 kodierenden Bereichs von Parvovirus B19 mit den für die Amplifizierung verwendeten Primer-Sequenzen.

Im oberen Teil ist der Aufbau des einzelsträngigen B19-Genoms mit den inversen Regionen an den Enden (Doppelstrang) sowie mit kodierenden Bereichen schematisch dargestellt. Im linken Bereich ist die kodierende Region für die Nicht-Strukturproteine (NS), die als Polypeptid synthetisiert und dann prozessiert werden. Der rechte Bereich kodiert für die Oberflächenproteine des viralen Kapsids (VP1/2), wobei VP1 bis auf einen zusätzlichen N-terminalen Bereich (schraffierter Balken) identisch mit VP2 (schwarzer Balken) ist. Darunter sind die Regionen der Oligodesoxynukleotide O-1 bis O-4 angegeben, die als Primer für die Amplifizierung (PCR) der dazwischen liegenden B19-Sequenzen verwendet wurden (O-1 und O-2 für den VP1-Bereich, bzw. O-3 und O-4 für VP2).

Im unteren Teil der Abbildung sind die DNA-Sequenzen der entsprechenden B19-Bereiche sowie die Oligodesoxynukleotide angegeben. Die Oligodesoxynukleotid-Sequenzen sind durch Fettdruck kenntlich gemacht, nicht-homologe Bereiche, d. h. Sequenzen, die nicht mit B19 hybridisieren, sind durch einen Zeilenabstand abgesetzt. Bei O-1 stellen diese nicht-hybridisierenden Sequenzen Restriktionsenzym-Stellen für EcoRI (GAATTC) und BclI (TGATCA) dar, bei O-3 für EcoRI BclI und BspHII (TC-ATGA), bei O-4 für HindIII (AAGCTT). Das amplifizierte VP2 kodierende Fragment (O-3 und O-4) wurde vor dem Einsetzen in pUC-Vektoren mit EcoRI und HindIII verdaut, das VP1 kodierende Fragment mit EcoRI und PstI, wobei die PstI-Schnittstelle in der B19-DNA liegt (ab Position-Nr. 4 der angegebenen Sequenz für O-2, CTGCAG).

Abb. 2 Aminosäure-Sequenzen der in Beispiel 2 beschriebenen Antigene, die rekombinant in E. coli-Zellen produziert werden.

Bedingt durch Klonierungsschritte sind an den N-Termini sowie an den C-Termini (bis auf PANSE und VP-2) jeweils einige nicht-B19-authentische Fremdaminosäuren mit enthalten, die durch Fettdruck hervorgehoben sind.

Beschrieben werden die Aminosäuresequenzen der in Beispiel 2 beschriebenen Antigene:

Abb. 2-1: PAN-1

Abb. 2-2: PCE-1

Abb. 2-3: PAN-2

Abb. 2-4: PAN-3

Abb. 2-5: PAN-4

Abb. 2-6: VP-2

Abb. 2-7: PANSE

Abb. 2-8: PAPST

Patentansprüche

1. Immunologisch aktives Peptid, das einen Teil der Aminosäuresequenz der Kapsidproteine VP1 oder VP2 des Parvovirus B19 aufweist, **dadurch gekennzeichnet**, daß es frei ist von Verunreinigungen, die den Nachweis von Parvovirus B19 spezifischen Antikörpern stören können. 5
2. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es 8 bis 50 Aminosäuren aufweist. 10
3. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß es 10 bis 32 Aminosäuren aufweist.
4. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys His Ile Lys
aufweist. 15
5. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Ser Lys-Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr
aufweist. 20
6. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser aufweist.
7. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His -
Pro His Ala
aufweist. 25
8. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val
aufweist. 30
9. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His -
Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu
aufweist. 35
10. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe
aufweist. 40
11. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 2 oder 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser
aufweist. 45
12. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser
Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu
Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln
Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu
Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys
Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe
Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser
Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val
Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val
Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu
Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg
Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile
Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu
Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val
Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Gly Glu Phe Ile Val
Thr Asp
aufweist. 50
13. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz
Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu
Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val
aufweist. 60

Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile
 Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro
 Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile
 Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His
 Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu
 Ser Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala
 Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser
 Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu
 Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Gly Asp Pro Arg
 Glu Phe Ile Val Thr Asp
 aufweist.

14. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

Gly Ile Leu Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys
 Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln
 Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu
 Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr
 Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu
 Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser
 Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu
 Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser His Ala
 Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu
 His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn
 Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln
 Ser Ala Val Gly Asp Pro Leu Glu Asp Pro Arg Val Pro Ser
 Ser Asn Ser
 aufweist.

15. Immunologisch aktives Polypeptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys
 Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln
 Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu
 Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu
 Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val
 Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr
 Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro
 His Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly
 Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly
 Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro
 Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp
 Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala
 Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp
 Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln
 Ala Gln Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala
 Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro
 Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val
 Asn Ser Ala Gly Arg Arg Ile Pro Gly Asn Ser Ser
 aufweist.

16. Immunologisch aktives Peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu His Ala Cys Met Leu Val
 Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln
 Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr
 Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val Asn
 Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu
 Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu
 Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro
 Pro Val Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe
 Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val
 Pro Asp Thr Leu Gly Gly Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr
 His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro Gln Asn Phe Met Pro Gly
 Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser Ser
 Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser Thr Gly
 Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val
 Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr
 Gly Ile Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn
 Ala Glu Asp Lys Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro
 Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met

His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln Tyr Thr Asp
 Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn Arg
 Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro
 Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly
 Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys
 Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys
 Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro
 Gly Val Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val
 Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg
 His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser
 Arg Val His Pro Leu
 aufweist.

5

10

17. Immunologisch aktives Peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ser Thr
 Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val Lys Ser Met Trp
 Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr
 Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His
 Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala
 Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met
 Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu
 Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu
 Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val
 Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr
 Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu
 Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu
 Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp
 Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp
 Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala
 Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe
 Gln Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys
 Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Arg Ser
 Thr Asp Pro Arg Glu Phe Thr Gly Arg Arg Phe Thr Thr Ser
 aufweist.

15

20

25

30

18. Immunologisch aktives Peptid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es die Aminosäuresequenz

35

Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys
 Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr
 Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr
 Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu
 Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser
 Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu
 Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser His Ala
 Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu
 His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn
 Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln
 Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr
 Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp
 Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu
 Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu
 Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu
 Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser
 aufweist.

40

45

50

19. Immunologisch aktives Peptid nach einem der vorhergehenden Ansprüche; dadurch gekennzeichnet, daß es als Fusionsprotein vorliegt, wobei dieses Fusionsprotein wenigstens einen Teil der β -Galactosidase oder der Glutathion-S-Transferase aufweist.

55

20. Testkit zum Nachweis von Antikörpern gegen das humane Parvovirus B19, dadurch gekennzeichnet, daß es wenigstens ein immunologisch aktives Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 19 aufweist, das mit den in den Untersuchungsflüssigkeiten vorhandenen Antikörpern reagieren kann und, daß es wenigstens eine Anzeige Komponente aufweist, die den Nachweis von Komplexen aus immunologisch aktivem Peptid und Antikörper ermöglicht.

60

21. Testkit nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Anzeige Komponente eine gegen den nachzuweisenden Antikörper gerichteter Antikörper ist, der eine Markierung aufweist.

22. Testkit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung in einem radioaktiven Isotop besteht.

65

23. Testkit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß die Markierung aus einem Enzym besteht, das eine Farbreaktion katalysieren kann.

24. Testkit nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß das immunologisch aktive Peptid biotinyliert ist

und die Anzeigekomponente Avidin oder Streptavidin mit daran kovalent gebundenem Enzym, insbesondere Peroxidase, ist.

25. Testkit nach einem der Ansprüche 21 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß es ein ELISA-Kit ist.

26. Testkit nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß wenigstens ein immunologisch aktives Peptid nach den Ansprüchen 1 bis 19 an Mikrotiterplatten gekoppelt ist und, daß die Anzeigekomponente aus anti-human IgG- und/oder IgM-Antikörpern besteht, an die ein Farbreaktion katalysierendes Enzym gekoppelt ist.

27. Testkit nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß monoklonale Antikörper gegen Human-IgM-Antikörper an Mikrotiterplatten gekoppelt sind und, daß die Anzeigekomponente ein biotinyliertes immunologisch aktives Peptid nach einem der Ansprüche 1 bis 14 ist, das mit Avidin oder Streptavidin mit daran kovalent gebundenem Enzym zusammenwirkt.

28. Verfahren zur Reinigung von immunologisch aktiven Peptiden nach den Ansprüchen 1 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß es eine Abtrennung unlöslicher Bestandteile, eine Auftrennung durch eine DEAE-Phazell-Säule und eine weitere Reinigung mittels einer Anionenaustauscher-Säule im HPLC in 8M Harnstoff umfaßt.

29. Verfahren nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß es außerdem eine Affinitäts-Chromatographie umfaßt.

30. Verfahren nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß die Affinitäts-Chromatographie mit einer Glutathion-gekoppelten Gel-Matrix erfolgt.

31. Verwendung von wenigstens einer DNA-Sequenz ausgewählt unter

O-1:

GTG AAT TCT GAT CAT ATG AGT AAA AAA AGT GGC AAA TGG,

O-2:

C TTC GGT CGT GAC CAC GTC CTC CCC

O-3:

G AGG AAT TCT CTG ATC ATG ACT TCA GTT AAT TCT GCA GAA GCC

O-4:

GAG GGG TGG CAC GGG AGT CCG TCC TTC GAA GAG

O-5:

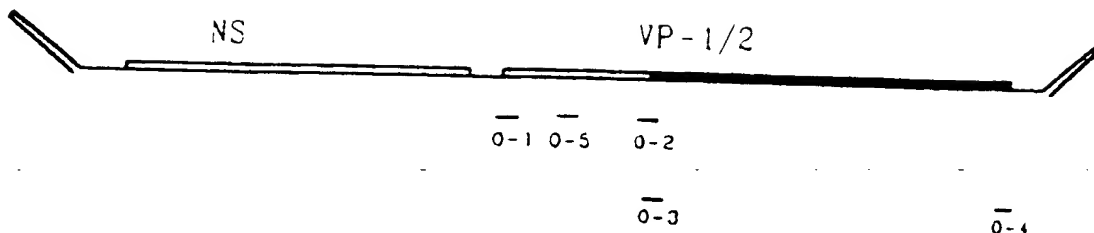
G CTA CAA GCT GGG CCC CCG CAA AG

zum direkten Erregernachweis mittels DNA-Amplifizierung, insbesondere mittels Polymerase-chain-reaction.

32. Verwendung von immunologisch aktiven Peptiden nach einem der Ansprüche 1 bis 18 als Impfstoff gegen Infektionen mit Parvovirus B19.

Hierzu 9 Seite(n) Zeichnungen

— Leerseite —



O-1:

5' GTG AAT TCT GAT CAT

5' AAA GCT TTG TAG ATT ATG AGT AAA AAA AGT GGC AAA TGG^{3'}
3' TTT CGA AAC ATC TAA TAC TCA TTT TTT TCA CCG TTT ACC ACC^{5'}

O-2:

5' ATT CTG CAG AAG CCA GCA CTG GTG CAG GAG GGG GGG GCA 3'
3' TAA GAC GTC TTC GGT CGT GAC CAC GTC CTC CCC CCC CGT 5'
 3' C TTC GGT CGT GAC CAC GTC CTC CCC 5'

O-3:

5' G AGG AAT TCT CTG ATC

5' A GAA AAA TAC CCA AGC ATG ACT TCA GTT AAT TCT GCA GAA GCC 3'
3' T CTT TTT ATG GGT TCG TAC TGA AGT CAA TTA AGA CGT CTT CGG 5'

O-4:

5' TTG TAA ACA CTC CCC ACC GTG CCC TCA GCC AGG ATG CGT A 3'
3' AAC ATT TGT GAG GGG TCC CAC GGG AGT CGG TCC TAC GCA T 5'
3' GAG GGG TGG CAC GGG AGT CGG TCC T
TC GAA GAG 5'

0-5

5' G CTA CAA GCT GGG CCC CCG CAA AG^{3'} -----
 5' GAG CTA CAA GCT GGG CCC CCG CAA AGT GCT GTT GAC AGT GCT^{3'}
 3' CAC GAT GTT CGA CCC GGG GGC GTT TCA CGA CAA CTG TCA CGA^{5'}

ABB. 1

Abb. 2

Abb. 2-1

PAN-1:

Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu
Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp
Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp
Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala Leu Ser Ser Ser Ser His Ala
Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro
Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg
Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu
Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly
Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro
Ser

Abb. 2-2

PCE:

Gluthation-S-Transferase -His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala
Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp
His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn
Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala
Leu Ser Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro
Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln
Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr
Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val
Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Gly Glu Phe Ile Val Thr Asp

Abb. 2-3

PAN-2

Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala
Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp
His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn
Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala
Leu Ser Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro
Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln
Ser Ala Val Gly Asp Pro Arg Glu Phe Ile Val Thr Asp

Abb. 2-4

PAN-3

Gly Ile Leu Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala
Lys Ala Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu
Lys Asp His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile
Lys Asn Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro
His Ala Leu Ser Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His
Lys Pro Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro
Pro Gln Ser Ala Val Gly Asp Pro Leu Glu Asp Pro Arg Val Pro Ser Ser Asn Ser

Abb. 2-5

PAN-4

Gly Ser Arg Arg Pro Asp His Met Ser Lys Lys Ser Gly Lys Trp Trp Glu Ser Asp Asp Lys Phe Ala Lys Ala
Val Tyr Gln Gln Phe Val Glu Phe Tyr Glu Lys Val Thr Gly Thr Asp Leu Glu Leu Ile Gln Ile Leu Lys Asp
His Tyr Asn Ile Ser Leu Asp Asn Pro Leu Glu Asn Pro Ser Ser Leu Phe Asp Leu Val Ala Arg Ile Lys Asn
Asn Leu Lys Asn Ser Pro Asp Leu Tyr Ser His His Phe Gln Ser His Gly Gln Leu Ser Asp His Pro His Ala
Leu Ser Ser Ser Ser Ser His Ala Glu Pro Arg Gly Glu Asn Ala Val Leu Ser Ser Glu Asp Leu His Lys Pro
Gly Gln Val Ser Val Gln Leu Pro Gly Thr Asn Tyr Val Gly Pro Gly Asn Glu Leu Gln Ala Gly Pro Pro Gln
Ser Ala Val Asp Ser Ala Ala Arg Ile His Asp Phe Arg Tyr Ser Gln Leu Ala Lys Leu Gly Ile Asn Pro Tyr
Thr His Trp Thr Val Ala Asp Glu Glu Leu Leu Lys Asn Ile Lys Asn Glu Thr Gly Phe Gln Ala Gln Val Val
Lys Asp Tyr Phe Thr Leu Lys Gly Ala Ala Ala Pro Val Ala His Phe Gln Gly Ser Leu Pro Glu Val Pro Ala
Tyr Asn Ala Ser Glu Lys Tyr Pro Ser Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Gly Arg Arg Ile Pro Gly Asn Ser Ser

Abb. 2-6

VP2:

Met Thr Met Ile Thr Asn Ser Leu Ile Met Thr Ser Val Asn Ser Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly
Gly Ser Asn Ser Val Lys Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser
Arg Gln Phe Leu Ile Pro Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn
Ala Ser Gly Lys Glu Ala Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe
Asn Ala Leu Asn Leu Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp
Ala Leu Thr Val Thr Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val Thr
Asp Ser Thr Thr Gly Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln
Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val
Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser
Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu Asn Leu
Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro Asp Thr Leu
Gly Gly Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro Gln Asn Phe Met Pro Gly Pro
Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser Ser Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr Gly Leu Ser
Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro Tyr His His Trp Asp Thr
Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp Lys Glu Tyr
Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn Met His Thr
Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser Val Trp Asn
Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys Thr Gln Phe
Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Gln Tyr Ala Val Gly Ile Met
Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly Val Tyr Pro
Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His His Arg His
Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu

Abb. 2-7

PANSE:

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu His Ala Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly
Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val
Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu
Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro
Glu Asn Leu Glu Gly Cys Ser Gln His Phe Tyr Glu Met Tyr Asn Pro Leu Tyr Gly Ser Arg Leu Gly Val Pro
Asp Thr Leu Gly Gly Asp Pro Lys Phe Arg Ser Leu Thr His Glu Asp His Ala Ile Gln Pro Gln Asn Phe Met
Pro Gly Pro Leu Val Asn Ser Val Ser Thr Lys Glu Gly Asp Ser Ser Asn Thr Gly Ala Gly Lys Ala Leu Thr
Gly Leu Ser Thr Gly Thr Ser Gln Asn Thr Arg Ile Ser Leu Arg Pro Gly Pro Val Ser Gln Pro Tyr His His
Trp Asp Thr Asp Lys Tyr Val Thr Gly Ile Asn Ala Ile Ser His Gly Gln Thr Thr Tyr Gly Asn Ala Glu Asp
Lys Glu Tyr Gln Gln Gly Val Gly Arg Phe Pro Asn Glu Lys Glu Gln Leu Lys Gln Leu Gln Gly Leu Asn
Met His Thr Tyr Phe Pro Asn Lys Gly Thr Gln Gln Tyr Thr Asp Gln Ile Glu Arg Pro Leu Met Val Gly Ser
Val Trp Asn Arg Arg Ala Leu His Tyr Glu Ser Gln Leu Trp Ser Lys Ile Pro Asn Leu Asp Asp Ser Phe Lys
Thr Gln Phe Ala Ala Leu Gly Gly Trp Gly Leu His Gln Pro Pro Pro Gln Ile Phe Leu Lys Gln Tyr Ala Val
Gly Ile Met Thr Val Thr Met Thr Phe Lys Leu Gly Pro Arg Lys Ala Thr Gly Arg Trp Asn Pro Gln Pro Gly
Val Tyr Pro Pro His Ala Ala Gly His Leu Pro Tyr Val Leu Tyr Asp Pro Thr Ala Thr Asp Ala Lys Gln His
His Arg His Gly Tyr Glu Lys Pro Glu Glu Leu Trp Thr Ala Lys Ser Arg Val His Pro Leu

Abb. 2-8

PAPST:

Met Thr Met Ile Thr Pro Ser Leu Ala Ala Glu Ala Ser Thr Gly Ala Gly Gly Gly Gly Ser Asn Ser Val Lys
Ser Met Trp Ser Glu Gly Ala Thr Phe Ser Ala Asn Ser Val Thr Cys Thr Phe Ser Arg Gln Phe Leu Ile Pro
Tyr Asp Pro Glu His His Tyr Lys Val Phe Ser Pro Ala Ala Ser Ser Cys His Asn Ala Ser Gly Lys Glu Ala
Lys Val Cys Thr Ile Ser Pro Ile Met Gly Tyr Ser Thr Pro Trp Arg Tyr Leu Asp Phe Asn Ala Leu Asn Leu
Phe Phe Ser Pro Leu Glu Phe Gln His Leu Ile Glu Asn Tyr Gly Ser Ile Ala Pro Asp Ala Leu Thr Val Thr
Ile Ser Glu Ile Ala Val Lys Asp Val Thr Asp Lys Thr Gly Gly Gly Val Gln Val Thr Asp Ser Thr Thr Gly
Arg Leu Cys Met Leu Val Asp His Glu Tyr Lys Tyr Pro Tyr Val Leu Gly Gln Gly Gln Asp Thr Leu Ala Pro
Glu Leu Pro Ile Trp Val Tyr Phe Pro Pro Gln Tyr Ala Tyr Leu Thr Val Gly Asp Val Asn Thr Gln Gly Ile
Ser Gly Asp Ser Lys Lys Leu Ala Ser Glu Glu Ser Ala Phe Tyr Val Leu Glu His Ser Ser Phe Gln Leu Leu
Gly Thr Gly Gly Thr Ala Ser Met Ser Tyr Lys Phe Pro Pro Val Pro Pro Glu Asn Leu Glu Gly Cys Arg Ser
Thr Asp Pro Arg Glu Phe Thr Gly Arg Arg Phe Thr Thr Ser